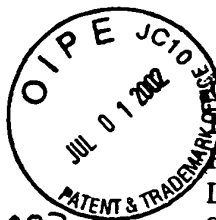


I hereby certify that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail in an envelope addressed to:

Assistant Commissioner for Patents

Washington, D.C. 20231 on June 24, 2002

David Saliwanchik  
David R. Saliwanchik, Patent Attorney



04004407-30-02  
0300  
CLAIM OF PRIORITY UNDER 35 USC §119

Examining Group

Patent Application

Docket No. BPD-103

Serial No. 10/071,509

COPY OF PAPERS  
ORIGINALLY FILED

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Art Unit : *not yet assigned*

Applicants : Alfred Fahr, Rolf Müller

Serial No. : 10/071,509

Filed : February 8, 2002

Conf. No. : 3436

For : Invasomes For Therapy of Diseases, Their Production and Use

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

CLAIM OF PRIORITY UNDER 35 USC §119

Sir:

The applicants in the above-identified patent application hereby reaffirm their claim to the right of priority granted pursuant to 35 USC §119 based upon German Application No. DE10105659.1, filed February 8, 2001.

As required by the Statute, a certified copy of the Germany application is being submitted herewith. The applicants request that this certified copy of the foreign priority application be made of record in the subject application pursuant to MPEP 201.14(b).

Respectfully submitted,

David Saliwanchik

David R. Saliwanchik

Patent Attorney

Registration No. 31,794

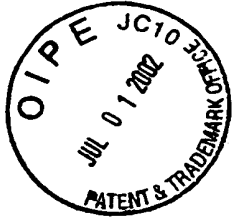
Phone No.: 352-375-8100

Fax No.: 352-372-5800

Address: 2421 N.W. 41st Street, Suite A-1  
Gainesville, FL 32606-6669

DRS/la

Attachment: Certified copy of priority document DE 10105659.1



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 101 05 659.1

**Anmeldetag:** 08. Februar 2001

**Anmelder/Inhaber:** vectron therapeutics AG IMT, Marburg/DE

**Bezeichnung:** Invasomen zur Therapie von Hauterkrankungen, ihre Herstellung und Verwendung

**IPC:** A 61 K 9/127

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 13. Mai 2002  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident  
Im Auftrag



07.02.01

- 1 -

vectron therapeutics AG

8. Februar 2001  
V35256 BÖ/Zw/dor/pvc

## **Invasomen zur Therapie von Hauterkrankungen, ihre Herstellung und Verwendung**

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Invasomen, die mindestens ein neutrales Lipid und mindestens ein Immunsuppressivum enthalten, deren Herstellung und deren Verwendung zur Therapie von Hauterkrankungen, die durch eine Beteiligung des Immunsystems der Haut gekennzeichnet sind.

10

Die topische Applikation hydrophiler oder hydrophober pharmakologisch wirksamer Substanzen mit dem Ziel die jeweilige Wirksubstanz in tiefere Hautschichten oder sogar durch die Haut hindurch zu transportieren ist ein schwieriges Unterfangen, da die oberste Schicht der Haut (Stratum corneum) für die meisten Substanzen undurchlässig ist. Für viele Wirksubstanzen wäre es jedoch wünschenswert, diese direkt durch die Haut zu applizieren. Beispielsweise ist die transdermale Verabreichung von Insulin für Diabetiker interessant, da dadurch die täglichen Insulinspritzen entfallen würden. Während ein solcher effizienter transdermaler Transport für alle Substanzen wünschenswert ist, die systemische Wirkung entfalten sollen, ist er nicht für Substanzen geeignet, deren Wirkung auf die tieferen Schichten der Haut beschränkt bleiben sollte. Dies gilt beispielsweise für Wirkstoffe, die bei systemischer Anwendung starke Nebenwirkungen und/oder Toxizität zeigen, die aber dennoch zur Therapie bestimmter Hauterkrankungen gut geeignet sind.

25

In der Literatur ist eine Vielzahl von Versuchen beschrieben worden, die Barriere der Haut zu überwinden. Besondere Aufmerksamkeit haben hierbei Liposomen erlangt. Mezei und Gulasekharam (Life Sci. 26: 1473-1777, 1980) waren die ersten, die berichteten, daß Liposomen, die mit Triamcinolonacetonid beladen waren eine 3- bis 5-fache Anhäufung des Wirkstoffs in der Epidermis und Dermis der Haut ermöglichten. Vanlerberghe et al. (Coll Nat. CRNS: 938-942, 1978)

30

zeigten, daß die Verwendung von Vesikeln aus nicht-ionischen oberflächenaktiven Substanzen (Niosomes) die Penetration von Natriumpyrrolidoncarboxylat durch das Stratum corneum erhöhten. WO 92/03122-A1 offenbarte die Verwendung von sogenannten „Transferosomen“, um Insulin systemisch zu verabreichen.

5 Die Transferosomen bestehen aus einem Lipidanteil und einer randaktiven Substanz. Die Transferosomen werden auch als „flexible“ Liposomen bezeichnet, die im Gegensatz zu Liposomen mit rigideren Strukturen in der Lage sind, Substanzen den Weg durch das Stratum corneum zu erleichtern. Diese Versuche zielten jedoch in erster Linie darauf, die jeweiligen Wirkstoffe möglichst effizient durch

10 die Haut in den Körper zu transportieren.

Auch bei Hauterkrankungen, an denen Zellen in tiefer liegenden Hautschichten, wie beispielsweise Zellen in der Stratum germinativum, beteiligt sind, ist es wünschenswert Wirkstoffe effizient durch die Barriere des Stratum corneums zu

15 transportieren. Ein wichtiges Beispiel hierfür sind Hauterkrankungen, an denen das Immunsystem der Haut beteiligt ist. Das Immunsystem der Haut bilden zum einen die in der Haut bereits vorhandenen Zellen, wie beispielsweise Dendritische-Zellen aber auch die jeweils bei Erkrankung, Infektion und/oder entzündlichen Prozessen in die Haut infiltrierenden Immunzellen, wie beispielsweise T-

20 Zellen, Langerhans-Zellen und Makrophagen. Bei diesen Hauterkrankungen ist beispielsweise eine gegenüber gesunder Haut erhöhte Infiltration bzw. Aktivierung der genannten Immunzellen zu beobachten, ohne daß tatsächlich eine Verwundung oder Infektion der Haut vorliegt. Es wird vermutet, daß viele dieser Erkrankungen, wie beispielsweise Alopecia areata, Psoriasis oder Neurodermitis,

25 auch durch Autoimmunreaktionen hervorgerufen werden.

Alopecia areata ist eine relativ häufige Erkrankung für deren Ausbruch über die gesamte Lebenszeit eine Wahrscheinlichkeit von 1,7% in der Bevölkerung besteht (Safavi et al. Mayo Clin. Proc. 70: 628-633, 1995). Alopecia areata geht mit ei-

30 nem reversiblen, auf begrenzte Areale beschränkten Haarverlust einher, kann jedoch manchmal auch zum kompletten Haarverlust führen (Alopecia totalis). Histopathologische Kennzeichen von Alopecia areata beinhalten perifolliculare lym-

phozytische Infiltration, die die anagenen Haarfollikel betreffen, mit anschließender Miniaturisierung dieser Follikel (Golnik und Orphanos, in Orphanos und Happle (Editoren) Hair and hair diseases. Berlin, Springer Verlag, Seiten 529-569, 1990). Diese Infiltrate bestehen in erster Linie aus T4-Lymphozyten, Makrophagen und Langerhans-Zellen (Tobin et al. J. Invest. Dermatol. 109: 329-333, 1997). Der Haarverlust ist mit peri- und intrafollikularer inflammatorischer Infiltration der anagenen Haarfollikel assoziiert, wobei das Infiltrat in erster Linie aus CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen bestehen. Die jeweilige Funktion dieser Zellen in der Pathogenese der Alopecia areata ist bisher unverstanden (Mc Elwee et al. B.J. Dermatol. 140: 432-437, 1999). Die beobachtete peribulbare und intrabulbare Anhäufung von T-Lymphozyten (Perret et al., Acta Derm. Venerol. 64:26-30, 1984) und eine fehlge-regelte Expression des „intercellular adhesion molecule 1“ (ICAM -1) und des HLA-DR Moleküls auf follikulären Keratinozyten und dermalen Papillen (Hamm et al., Arch. Dermatol. Res. 280:179-181, 1988; Nickoloff & Griffiths, J. Invest. Dermatol. 96:91-92, 1991) deuten jedoch darauf hin, daß das Immunsystem der Haut an der Erkrankung beteiligt ist (Baadsgaard Dermatol. 96:89-89, 1991).

Zur Behandlung dieser Hauterkrankungen bieten sich deshalb immunmodulierende Substanzen an, die beispielsweise die Immunantwort unterdrücken. Solche Substanzen, die bisher vor allem zur systemischen Behandlung dieser Hauterkrankungen verwendet wurden, sind beispielsweise Cyclosporin A oder FK 506. Der Nachteil der systemischen Anwendung immunmodulatorischer Substanzen liegt beispielsweise bei Cyclosporin A in der Nephrotoxizität, eine Nebenwirkung, die bei der Verwendung von Cyclosporin zur Vermeidung von Transplantatabstoßungsreaktionen tolerierbar ist, jedoch nicht bei der Behandlung nicht unmittelbar lebensbedrohender Hauterkrankungen.

Die im Stand der Technik beschriebenen Versuche, die systemische Gabe von Immunsuppressiva durch topische Applikation zu vermeiden, waren jedoch bisher nicht erfolgreich. Die verwendeten Verfahren führten entweder zu einem ungenügenden Transport durch das Stratum corneum oder führten zu einer unerwünschten Erhöhung der Wirkstoffkonzentration im Serum, d.h. systemischer Wirkung.

- Beispielsweise zeigte Griffiths et al. (Lancet I: 806, 1987), daß eine Lösung, die aus 2% Cyclosporin A in Unguentum Merk hergestellt wurde, zu keinerlei Effekt bei der Behandlung von Psoriasis führte. Black et al. (J. Inves. Dermatol. 5: 644-648, 1990) verwendeten neben systemisch verabreichtem Cyclosporin ein öliges
- 5 mit Cyclosporin beladenes Vehikel um die T-Zell-vermittelte Immunantwort in der Haut zu verringern. Sie beobachteten eine verringerte T-Zell-vermittelte Immunantwort, beobachteten jedoch auch nach Beendigung der systemischen Gabe und ausschließlicher topischer Gabe eine erhöhte systemische Cyclosporinmenge. Gleichmaßen hat Gilha et al. (Acta Derm. Medarol, 69: 252-253, 1989) mit ei-
- 10 ner 10% Cyclosporin A-Lösung in einer öligen Zubereitung keinen Effekt auf Alopecia areata gesehen, stellt jedoch auch keine erhöhten Cyclosporin Level im Blut der Patienten fest. Niemiec et al. (Farm. Retres. 12:1184-1188, 1995) verwendeten drei verschiedene nicht-ionische Liposomen und untersuchten den Transport von Cyclosporin A in einem Hamsterohrmodell. Eine Einlagerung von
- 15 Cyclosporin A wurde nur bei Verwendung von Liposomen beobachtet, die aus Glyceryldilaurat/Colesterol/Polyoxyethylen-10-Stearylether im Mischungsverhältnis 57:15:28 Gew.-% bestanden. Eine auf Phospholipid basierende Liposomenzubereitung führte nur zu einer minimalen Aufnahme von Cyclosporin A in die Haut.
- 20
- Guo et al. (Int. J. Farm. 194: 201-207, 2000) verwendeten die von Cevc et al. (Adv. Drug. Del. Rev. 18: 349-378, 1996 und in WO 92/03122) beschriebenen Transferosomen, um Cyclosporin in die Haut zu transportieren. In dieser Studie wurde jedoch bereits 2 Stunden nach Anwendung der Transferosomen eine
- 25 Serumkonzentration von 63 ng/ml Cyclosporin beobachtet. Die von Guo et al. verwendeten Vesikel wurden aus hochreinem Lecithin und dem Tensid Natriumchololat hergestellt. Die Autoren ziehen aus den Ergebnissen den Schluss, daß es möglich ist, Cyclosporin systemisch über die Haut zu verabreichen.
- 30
- Der Mangel an geeigneten Transportsystemen, die es erlauben würden, den Effekt eines immunsuppressiven Wirkstoffes auf die jeweils zu behandelnden Bereiche der Haut zu beschränken, zeigt sich auch darin, daß bei drei wichtigen Hauter-

krankungen, an denen das Immunsystem der Haut beteiligt ist, d.h. bei aktiver Psoriasis, atopischer Dermatitis und Alopecia areata, die Behandlung immer noch mit systemisch verabreichten Cyclosporin A erfolgt (Iconomidou et al. (Dermatol. 199: 144-148, 1999; Naeyaert et al. Dermatol. 198: 145-152, 1999 und Ferando und Grimalt, Dermatol. 199: 86-69, 1999).

Da bei einer Reihe von Tieren Erkrankungen beschrieben worden sind, die dem Haarverlust der menschlichen Alopecia areata ähneln, ist diese Erkrankung geeignet, als Modellsystem zur Identifizierung geeigneter Transportsysteme zu dienen.

10 Eine Form des reversiblen Haarverlustes, der klinisch und histopathologisch der humanen Alopecia areata entspricht, ist beispielsweise für DEBR-Ratten beschrieben worden (Sundberg et al., J. Invest. Dermatol. 104: 32-33, 1995). DEBR-Ratten entwickeln etwa 6 Monaten nach der Geburt die Symptome der Krankheit, wobei sich in einigen Ratten-Kolonien die Erkrankung nach 18 Monaten bei 20%

15 aller Tiere durchgesetzt hat.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde eine mit Cyclosporin A beladene Liposomenform, Invasomen genannt, gefunden, mit der der partielle Haarausfall der DEBR-Ratten erfolgreich behandelt werden konnte, ohne daß die Anwendung

20 der Invasomen gleichzeitig zu einer meßbaren Erhöhung der Cyclosporin A Menge im Serum führte.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb ein Invasom, das mindestens ein neutrales Lipid in einem Lipidgemisch, wobei das neutrale Lipid an dem Lipidgemisch ein Anteil im Bereich von ca. 60 bis ca. 94 Gew.-% hat, und mindestens ein Immunosuppressivum enthält.

25

Der Begriff „Invasom“ bezeichnet ein unilamellares, bilamellares, oligolamellares (3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, oder 10 Lamellen) oder multilamellares (mehr als 10 Lamellen)

30 lipidhaltiges Vesikel, das nur eine geringe Menge des jeweilig enthaltenen Immunsuppressivums transdermal transportiert, so daß das Immunsuppressivum nur eine geringe Konzentration im Serum des Patienten erreicht und deshalb keine

oder nur eine geringe systemische Wirkung entfalten kann. Bei Verwendung der erfindungsgemäßen Invasomen in therapeutisch wirksamen Mengen kann ca. 14 Stunden nach Applikation höchstens ca. 200 ng/ml, insbesondere höchstens ca. 150 ng/ml besonders bevorzugt höchstens ca. 70 ng/ml und am meisten bevorzugt höchstens ca. 50 ng/ml des jeweiligen Immunsuppressivums im Serum des Patienten nachgewiesen werden. Vorzugsweise liegt die Serumkonzentration des Immunsuppressivums ca. 14 Stunden nach Applikation unter der Nachweisgrenze des jeweiligen Wirkstoffs im Serum. Geeignete Nachweisverfahren sind abhängig vom verwendeten Immunsuppressivum beispielsweise HPLC, ELISA, RT-PCR oder Gaschromatographie.

Die lamellare Struktur des erfindungsgemäßen Invasoms kann auch durch eine ungerade Anzahl von Lamellen, wie beispielsweise 1, 3, 5, 7, 9 oder 11 Lamellen gebildet werden, wobei eine Seite das hydrophobe Innere des Vesikels und die andere Seite das hydrophile Äußere bildet. Diese Art von Vesikel ist besonders geeignet, um beispielsweise hydrophobe Immunsuppressiva aufzunehmen.

Die erfindungsgemäßen Invasomen enthalten das Lipidgemisch und das (die) Immunsuppressivum(a) in einem Gewichtsverhältnis im Bereich von ca. 1:1 bis ca. 500:1 [Lipidgemisch:Immunsuppressivum(a)], vorzugsweise im Bereich von ca. 2:1 bis ca. 100:1, bevorzugterweise im Bereich von ca. 5:1 bis ca. 50:1, noch bevorzugter im Bereich von ca. 15:1 bis ca. 30:1 und am meisten bevorzugt im Bereich von ca. 18:1 bis ca. 22:1.

Das im Invasom enthaltene Lipidgemisch stammt aus pflanzlichen und/oder tierischen Quellen, die entweder durch weitere Reinigungsverfahren, die auf die Anreicherung neutraler Lipide gerichtet sind, einen Anteil im Bereich von ca. 60 bis ca. 94 Gew.-% neutrale Lipide an der Gesamtmenge des Lipidgemischs enthalten oder die natürlicherweise neutrale Lipide im angegebenen Bereich enthalten. Verfahren zur Gewinnung von Fetten und Ölen und zur Anreicherung einzelner Komponenten sind im Stand der Technik bekannt und beispielsweise in Uhlmanns Enzyklopädie der technischen Chemie, Band 11, Seiten 455-523, 1976 beschrieben.



ben. Der Begriff Lipidgemisch umfaßt auch Gemische, die aus Lipiden verschiedener Quellen beispielsweise verschiedenen Pflanzen stammen, solange das Gemisch neutrale Lipide im angegebenen Bereich von ca. 60 bis ca. 94-Gew.-% enthält.

5

Ein neutrales Lipid im Sinne der vorliegenden Erfindung ist jede Substanz, die neutrale fettartige oder fettähnliche Eigenschaften besitzt und wobei diese Substanz über einen ausgedehnten apolaren Anteil und einen polaren, wasserlöslichen Anteil verfügen, der ein oder mehrerer positive und negative Ladungsträger enthält, wobei in dem polaren Anteil jeweils die selbe Anzahl von positiven und negativen Ladungsträgern vorhanden ist. Daher weisen Invasomen, die neutrale Lipide enthalten, abhängig vom neutralen Lipid(en) im Bereich von ca. pH 6,0 bis ca. 8,0, vorzugsweise im Bereich von ca. pH 6,5 bis ca. 7,5 und besonders bevorzugt bei ca. pH 7,0 eine neutrale Gesamtladung auf.

15

Der Begriff Immunsuppressiva umfaßt alle Substanzen, die die Funktion von Zellen beeinflussen, die an der Vermittlung der Immunantwort direkt oder indirekt beteiligt sind und wobei die Beeinflussung zu einer Verringerung der Immunantwort führt. Zu diesen Zellen gehören beispielsweise Makrophagen, dendritische Zellen, Langerhans-Zellen, indeterminierte Zellen, aber auch Zellen, die nicht zum Immunsystem selbst gehören, die aber an Immunerkrankungen der Haut beteiligt sind, wie Fibroblasten, Keratinozyten und Melanozyten. Die Stärke der Immunantwort läßt sich beispielsweise durch die Menge der ausgeschütteten Zytokine oder die Anzahl der aktivierten T-Zellen in der Haut bestimmen.

25

Ein erfindungsgemäßes Invasom hat eine Größe zwischen 20 und 1000 nm. Die Größenverteilung der Invasomen ist von der Herstellungsmethode abhängig. So führt Sonifizierung der Lipidgemische zu kleinen Vesikeln, während „Vortexen“ zu größeren Vesikeln führt. Vesikel innerhalb einer bestimmten Größenklasse lassen sich durch im Stand der Technik bekannte Methoden wie Mikrofiltration oder Zentrifugation auswählen.

30

Die erfindungsgemäßen Invasom haben in einer bevorzugten Ausführungsform einen Durchmesser im Bereich von ca. 30 bis ca. 200 nm, insbesondere im Bereich von ca. 40 bis ca. 150 nm und besonders bevorzugt im Bereich von ca. 50 bis ca. 100 nm. Die Größe der Vesikel hat Einfluß auf die Permeationsfähigkeit der Vesikel, wobei kleinere Vesikel im Bereich von ca. 30 bis ca. 200 nm eine bessere Durchdringungsfähigkeit des Stratum comeums aufweisen, als größere Vesikel mit einem Durchmesser von beispielsweise ca. 600 bis ca. 800 nm.

- Bevorzugte Quellen zur Gewinnung des Lipidgemischs, das zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Invasoms verwendet werden kann, sind Lipidgemische, die aus Ölsaaten, insbesondere aus Sojabohnen, Kattunsamen, Kokosnußkern, Erdnuß, Saflorsamen, Sesamsamen, Sonnenblumensamen, Leinsamen, Raps, Weizenkeimen, Oliven oder tierischen Fetten, insbesondere Walfett, Stratum corneum Lipid, Rinderklauenöl und/oder Ei gewonnen wird. Eine besonders bevorzugte Quelle für Lipidgemische sind Sojabohnen. Eine Anreicherung der neutralen Lipide in den aus diesen Ausgangsmaterialien gewinnbaren Lipidgemischen ist beispielsweise durch chromatographische Verfahren, wie HPLC und andere im Stand der Technik bekannte Verfahren möglich (siehe Uhlmann, 1976, Supra).
- In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Invasoms ist der Gewichtsanteil des neutralen Lipids an dem Gesamtlipidgemisch im Bereich von ca. 70 bis ca. 92 Gew.-% noch bevorzugter im Bereich von ca. 80 bis ca. 90 Gew.-% und am meisten bevorzugt ca. 80 Gew.-%. Eine Erhöhung des neutralen Lipidanteils über ca. 60% führt zu einer Verbesserung der Permeationseigenschaften, die sich jedoch bei weiterer Erhöhung des Anteils an neutralen Lipid an dem Lipidgemisch wieder verschlechtern. So erlangt ein nahezu reines neutrales Lipid erst wieder durch den Zusatz von oberflächenaktiven Substanzen (siehe Guo et al., 2000 Supra und WO 92/03122), wie beispielsweise Tensiden, die Fähigkeit das Stratum corneum zu durchdringen, was aber andererseits dann auch zur Durchdringung der weiteren Hautschichten und letztlich zu einer systemischen Freisetzung des jeweiligen Wirkstoffes führt.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Invasoms ist das neutrale Lipid ein Glycerophospholipid, insbesondere ein Phosphatidylcholin, ein Steroid, ein Glycerophosphonolipid, ein Glycerophosphinolipid und/oder ein Sphingolipid. Besonders bevorzugt ist hierbei jedoch ein Glycerophospholipid, insbesondere ein Phosphatidylcholin. Geeignete Phosphatidylcholin-haltige Lipidgemische sind beispielsweise mit einem Anteil von 80 Gew.-% an der Gesamtlipidmischung kommerziell erhältlich. Phospholipon 80 (Nattermann Phospholipid GmbH) ist ein solches Lipidgemisch, das auch als ethanolische Lösung erhältlich ist (Nat 8539).

10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Invasom, das zusätzlich ein oder mehrere Terpene enthält. Terpene im Sinne der vorliegenden Erfindung umfassen Polymerisationsprodukte des Kohlenwasserstoffs Isopren. Nach der Anzahl der Isopren-Reste unterscheidet man Monoterpene ( $C_{10}$ ), Sesquiterpene ( $C_{15}$ ), Diterpene ( $C_{20}$ ), Sesterpene ( $C_{25}$ ), Triterpene ( $C_{30}$ ), Tetraterpene ( $C_{40}$ ) und Polyterpene. 15 Die aus den Isopren-Grundeinheiten gebildeten azyklischen Kohlenwasserstoffe können beispielsweise durch anschließende Substitutionen, Oxidation, Zyklisierungen und Umlagerung in eine Vielzahl von Verbindungen umgewandelt werden. Unter Terpenen im Sinne der vorliegenden Erfindung versteht man auch die 20 abgeleiteten Alkohole, Ketone, Aldehyde und Ester.

Terpene werden dem Lipidgemisch im Bereich von ca. 0,1 bis ca. 200 Gew.-% bezogen auf die Menge des Lipidgemischs zugesetzt. Vorzugsweise jedoch im Bereich von ca. 5 bis ca. 100 Gew.-%, noch bevorzugter im Bereich von ca. 30 bis 25 ca. 80 Gew.-% und am meisten bevorzugt im Bereich von ca. 50 bis ca. 60 Gew.-%. Wenn die zugesetzte Terpenmenge zu hoch wird, unterbinden die Terpene die Bildung der Invasomen. Die jeweilige Terpenmenge, die die Invasomenbildung behindert, hängt von dem verwendeten Lipidgemisch und dem verwendeten Immunsuppressivum ab. Ob die gewählte Terpenmenge die Invasomenbildung 30 behindert läßt sich leicht durch eines der nachfolgend beschriebenen Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemäßen Invasomen testen. Messung der Anisotropie

von Invasomen haben gezeigt, daß Invasomen, die Terpene enthalten, einer gegenüber nicht Terpen-haltigen Invasomen eine verringerte Flexibilität aufweisen.

In einer bevorzugten Ausführungsform enthält das erfindungsgemäße Invasom ein  
5 oder mehrere der folgenden Terpene: Cineol, Citral, Limonen, insbesondere D-Limonen, Menthan, Terpinen, Terpinolen, Menthol, insbesondere 1-Menthol, Carveol, insbesondere 1-Carveol, Menthon, Carvon, Pinen, insbesondere  $\beta$ -Pinen, Caren, insbesondere 3-Caren, Terpeneol, Terpinen-4-ol, Pulegon, Piperiton, Cyclohexanoxid, Limonenoxyd, Pinenoxyd, Cyclopentenoxid, Ascaridol, 7-  
10 Oxybicyclo-[2.2.1]-heptan, Cymol, Camphen, Citronellol, Geraniol, Nerol, Linalool, Borneol, Thujol, Sabinol, Myrtenol, Thymol, Verbenol, Fenchol, Piperitol, Perillaaldehyd, Phellandral, Citronellal, Myrtenal, Piperiton, Thujon, Umbellolun, Verbenon, Chrysanthemon, Fenchon, Campher, Chinon, Menthofuran, Linalooloxid, Rosenoxid und/oder Quinghaosu, wobei die verschiedenen Struktur- und  
15 Konfigurationsisomere der vorangenannten Terpene umfaßt sind.

Das Invasom kann einzelne Terpene oder Terpengemische enthalten. Besonders bevorzugt ist ein Invasom, das eine Mischung aus D-Limonen, Cineol und Citral enthält, wobei diese beispielsweise in einem Mischungsverhältnis im Bereich von  
20 ca. 2:49:49 bis ca. 1:1:1, vorzugsweise im Bereich von ca. 4:48:48 bis ca. 1:3:3 und besonders bevorzugt im Bereich von ca. 10:45:45 vorliegen.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Invasoms ist das Immunosuppressivum ein Glucokortikoid, insbesondere Beclomethason, Beta-  
25 methason, Clocortolon, Cloprednol, Cortison, Dexamethason, Fludrocortison, Fludroxycortid, Flumetason, Fluocinolonacetonid, Fluocinonid, Fluocortolon, Fluormetholon, Fluprednidenacetat, Hydrocortison, Paramethason, Prednisolon, Prednison, Prednylidin, Pregnenolon, Triamcinolon oder Triamcinolonacetonid, ein Cylosporin, insbesondere Cyclosporin A, Mycophenolatmofetal, Tacrolimus,  
30 FK 506, Azathioprin, Ganciclovir, ein Anti-Lymphozytenglobulin, Ascomycin und/oder Methotrexat ist. Ein bevorzugtes Invasom der vorliegenden Erfindung enthält Cyclosporin A als Immunosuppressivum.

In einer weiteren Ausführungsform enthält das erfindungsgemäße Invasom eine Nukleinsäure, die für mindestens ein immunsupprimierendes Peptid (Länge von 1 bis 50 Aminosäuren) und/oder Protein (länger als 50 Aminosäuren) kodiert. In diesem Fall werden die im Invasom enthaltenen Nukleinsäuren in Hautzellen eingeführt, ein solches Einführen wird auch als Transfektion bezeichnet. Geeignete Nukleinsäuren kodieren beispielsweise für IL-10, TGF- $\beta$  oder CTLA4-Ig (siehe z.B. Abrams et al. J Clin Invest 103: 1243-52, 1999). Die Erfindung umfaßt auch Nukleinsäuren, die für die vorangenannten Peptide oder Proteine kodieren, deren Aminosäuresequenz jedoch Additionen, Substitutionen, Deletionen oder Mutationen einzelner Aminosäuren oder Aminosäuregruppen aufweist. Bevorzugt sind dabei sogenannte konservative Mutationen wie beispielsweise der Austausch eines Glutaminsäurerest gegen einen Asparaginsäurerest, Deletion oder Substitution von Bereichen des Proteins, die nicht für die immunsupprimierende Wirkung verantwortlich sind. Die Nukleinsäuren können beispielsweise als Einzelstrang- oder Doppelstrang-DNA oder als RNA vorliegen, vorzugsweise jedoch als doppelsträngige DNA.

Die Nukleinsäure kann Teil eines Vektors sein, wobei Vektoren bevorzugt sind, die bei Transfektion einer Zelle zu einer dauerhaften Expression des Immunsuppressivums führen, wie beispielsweise episomal oder extrachromosomal replizierende Vektoren.

Die Nukleinsäure kann zusätzlich 5' oder 3' vom offenen Leserahmen, der für das immunsupprimierende Peptid oder Protein kodiert, Regulationselemente enthalten. Für die Expression sind beispielsweise Regulationselemente geeignet, die eine konstitutive, regulierbare, gewebsspezifische, zellzyklusspezifische oder metabolischspezifische Expression in eukaryotischen Zellen erlauben. Regulationselement gemäß der vorliegenden Erfindung umfassen Promotor-, Aktivator-, Enhancer-, Silencer und/oder Repressor-Sequenzen.

Beispiel für geeignete Regulationselemente, die konstitutive Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren, die von der RNA Polymerase III erkannt werden oder virale Promotoren, CMV-Enhancer, CMV-Promotor, SV40 Promotor oder LTR-Promotoren z. B. von MMTV (mouse mammary tumour virus; Lee et al. (1981) Nature 214, 228-232) und virale Promotor- und Aktivatorsequenzen, die beispielsweise aus HBV, HCV, HSV, HPV, EBV, HTLV oder HIV abgeleitet sind.

Beispiele für Regulationselemente, die induzierbare Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind der Tetracyclinoperator in Kombination mit einem entsprechenden Repressor (Gossen et al. Curr. Opin. Biotechnol. 5, 516-20, 1994).

Beispiele für Regulationselemente, die gewebspezifische Expression in Eukaryonten ermöglichen, sind Promotoren oder Aktivatorsequenzen aus Promotoren oder Enhancern von solchen Genen, die für Proteine kodieren, die nur in bestimmten Zelltypen, vorzugsweise Zellen des Immunsystems, exprimiert werden. Im Stand der Technik ist eine Vielzahl von Immunzell-spezifischen Regulationselementen beschrieben worden, die alle geeignet sind, die Expression des Immunsuppressivums zu regulieren, besonders bevorzugt sind jedoch in T-Zellen aktive Promotoren oder in T-Zellen aktive Promotorfragmente, wie beispielsweise Promotoren oder Promotorfragmente der folgenden Gene: CD4, CD8 (beschrieben in z.B. Ellmeier et al. Annu. Rev. Immunol. 17: 523-54, 1999), IL-3, IL-4, IL-5, IL-13, GM-CSF (beschrieben in z.B. De Boer et al. Int. J. Biochem. Cell Biol. 31: 1221-36, 1999) oder synthetische Promotoren mit NF-AT Bindestellen (beschrieben in z.B. Hooijberg et al. Blood 96: 459-466, 2000). Besonders geeignete Promotoren sind nur in aktivierten T-Zellen aktiv und erlauben es dadurch, die Wirkung des(r) Immunsuppressivums(a) auf die T-Zellen selbst und ihre unmittelbare Umgebung zu beschränken.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist das erfindungsgemäße Invasom in der Lage, therapeutisch wirksame Mengen mindestens eines Immunsuppressivums durch das Stratum corneum der Haut zu transportieren. Der Übergang vom Stra-

tum corneum zu tieferen Hautschichten, wie beispielsweise dem Stratum granulosum, dem Stratum spinosum und dem Stratum basale, läßt sich histologisch bestimmen. Beispielsweise ist der Übergang von platten, kernlosen und verhornten Zellen zu abgeplatteten Körnerzellen für das Ende des Stratum corneums und den Beginn des Stratum granulosums charakteristisch. Die Methoden und Kriterien zur histologischen Bestimmung dieser Übergänge sind dem Fachmann bekannt. Die Verteilung des Immunsuppressivums in der Haut läßt sich beispielsweise mit einem Klebestreifenabziehverfahren (Michel et al., Int. J. Pharm 84: 93-105, 1992) bestimmen. Hierbei wird die Haut nach Anwendung der erfindungsgemäßen Invasomen Schicht um Schicht mit Klebestreifen abgetragen und dann die Menge des Immunsuppressivums in Abhängigkeit vom Abstand zur Hautoberfläche bestimmt. Die Bestimmung der therapeutischer Wirkung kann beispielsweise wie im Beispiel 2 erfolgen, in dem auf zwei angrenzende Hautareale eines Patienten oder eines Tieres, die von einer Hauterkrankung betroffen sind, die durch die Beteiligung des Immunsystems der Haut gekennzeichnet ist, jeweils Invasomen die Immunsuppressivum oder Invasomen die kein Immunsuppressivum enthalten, aufgetragen werden. Die therapeutische Wirkung kann über einen Rückgang klinischer Parameter wie Rötung, Schwellung und/oder Erwärmung oder durch die Verringerung der Menge der in der Haut exprimierten Zytokine und/oder die Verringerung der Anzahl der Immunzellen bzw. aktivierten Immunzellen in der Haut bestimmt werden. Eine therapeutische Wirkung liegt vor, wenn die Expression des jeweiligen Zytokins in der Haut, die mit Invasomen enthaltend Immunsuppressivum behandelte wurde, gegenüber der Haut, die mit Invasomen ohne Immunsuppressivum behandelte wurde, um mindestens das ca. 2-fache, vorzugsweise um mindestens das ca. 5-fache, bevorzugter um mindestens das ca. 10-fache und am meisten bevorzugt um mindestens das ca. 20-fache verringert ist oder wenn die Menge der Immunzellen, insbesondere der aktivierten Immunzellen, in der Haut, die mit Invasomen enthaltend Immunsuppressivum behandelte wurde, gegenüber der Haut, die mit Invasomen ohne Immunsuppressivum behandelte wurde, um mindestens ca. 30%, vorzugsweise um mindestens ca. 100%, bevorzugter um mindestens ca. 200% und am meisten bevorzugt um mindestens ca. 500% verringert ist.

Das Immunsystem der Haut bilden zum einen die in der Haut bereits vorhandenen Zellen, wie beispielsweise Dendritische-Zellen, aber auch die jeweils bei Erkrankung, Infektion und/oder entzündlichen Prozessen in die Haut infiltrierenden Immunzellen, wie beispielsweise T-Zellen, Langerhans-Zellen und Makrophagen. Bei einer Beteiligung des Immunsystems der Haut ist beispielsweise eine gegenüber gesunder Haut erhöhte Infiltration der Immunzellen in die Haut bzw. Aktivierung der genannten Immunzellen zu beobachten, ohne daß tatsächlich eine Verwundung oder Infektion der Haut vorliegt. Ob an einer Hauterkrankung das Immunsystem der Haut beteiligt ist, läßt sich durch die klinisch bestimmbaren Parameter Rötung, Erwärmung und/oder Schwellung der Haut erkennen. Bei Vorliegen dieses Befunds wird vorzugsweise als weiteres Kriterium die Menge der in der Haut exprimierten Zytokine und/oder die Anzahl der Immunzellen bzw. aktivierten Immunzellen in der Haut herangezogen.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Invasoms, dadurch gekennzeichnet, daß das Lipidgemisch, das mindestens ein neutrales Lipid enthält, wobei das neutrale Lipid an dem Lipidgemisch einen Anteil im Bereich von ca. 60 bis höchstens ca. 94 Gew.-% hat, und mindestens ein Immunsuppressivum gemischt werden.

In einer Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird eine alkoholische Lösung des Lipidgemischs mit mindestens einem Immunsuppressivum beispielsweise durch Vortexen gemischt. Zur Lösung des Lipidgemischs geeignete Alkohole sind beispielsweise Ethanol, n-Propanol, Isopropanol, n-Butanol, Isobutanol und/oder n-Pentanol aber auch längerkettige Alkohole oder höhere Alkohole, die geeignet sind das jeweilige Lipidgemisch zu lösen. Vor oder nach der Zugabe mindestens eines Immunsuppressivums können dem Gemisch ggf. Terpene hinzugefügt werden. Das Lipidgemisch kann in dem Alkohol in einem Gewichtsverhältnis im Bereich von ca. 10:1 bis ca. 1:100 (Alkohol:Lipidgemisch), vorzugsweise im Bereich von ca. 2:1 bis ca. 1:20, bevorzugterweise im Bereich



von ca. 1:1 bis ca. 1:10, noch bevorzugter von ca. 1:2 bis ca. 1:8 und am meisten bevorzugt von ca. 1:3 bis ca. 1:4 gelöst werden.

Das Gemisch (mit oder ohne Terpene) kann anschließend durch Ultraschall sonifiziert werden. In einem weiteren Schritt kann dem Gemisch aus Lipidgemisch und Immunsuppressiva, das ggf. Alkohol und/oder Terpene enthält, unter Rühren Puffer oder auch destilliertes Wasser hinzugefügt werden. Als Puffer ist jeder physiologisch verträgliche Puffer, insbesondere Phosphatpuffer, geeignet. Der zugesetzte Puffer oder das zugesetzte Wasser kann dabei in einem Bereich von ca. 5 bis ca. 98 Gew.-%, vorzugsweise von ca. 30 bis ca. 95 Gew.-%, besonders bevorzugt von ca. 60 bis ca. 90 Gew.-%, noch bevorzugter von ca. 80 bis ca. 88 Gew.-% an der Gesamtmischung ausmachen. Durch diesen Schritt entsteht eine sogenannte grobkörnige Suspension, in der die erfindungsgemäßen Invasomen aufgeschlämmt sind. Die so hergestellten Invasomen sind im Puffer suspendiert, können aber auch Puffer oder Wasser enthalten.

Diese multilamellaren Vesikel können zur Herstellung von Invasomen bestimmter Größe in einem weiteren Schritt beispielsweise sonifiziert werden oder durch Polycarbonatmembranen mit definierter Porenweite, wie beispielsweise 400, 200, 100 oder 50 nm, filtriert werden.

Ein weiteres im Stand der Technik bekanntes Verfahren zur Herstellung von Liposomen, das auch zur Herstellung der erfindungsgemäßen Invasomen geeignet ist, ist das Rotationsverdampfungsverfahren (Weiner et al., Antimicrob. Agents Chemother. 33: 1217-1221, 1989). Bei diesem Verfahren wird das Lipidgemisch am Boden eines Rundkolbens getrocknet und dann durch das Hinzufügen einer wäßrigen Lösung, die die Immunsuppressiva und ggf. Terpene, Alkohole und/oder Puffer enthält, unter Schütteln dispergiert. Nach der Hydratation werden die so erhaltenen multilamellaren Vesikel beispielsweise durch Polycarbonatmembran definierter Porengröße extrudiert oder auch sonifiziert, um Invasomen einer bestimmten Größe zu erhalten.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird dem Lipidgemisch und dem Immunsuppressivum kein Tensid hinzugefügt. Der Begriff Tenside umfaßt nichtionische Tenside, wie beispielsweise Tween oder Triton, zwitterionische Tenside wie beispielsweise CHAPS oder CHAPSO, kationische oder anionische Tenside, wie beispielsweise Laurylsulfat oder Lauroleyl.

Die vorliegende Erfindung umfaßt auch Invasomen, die nach einem der vorangeannten Verfahren hergestellt werden.

- 10 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Arzneimittel, das ein erfindungsgemäßes Invasom und geeignete Hilfs- und Zusatzstoffe enthält. Beispiele für solche Hilfs- und Zusatzstoffe sind physiologische Kochsalzlösungen, Ringer-Dextrose, Dextrose, Ringer-Laktat, entmineralisiertes Wasser, Stabilisatoren, Antioxidantien, Komplexbildner, antimikrobielle Verbindungen, Proteaseinhibitoren, inerte Gase, Gelformulierungen, wie beispielsweise weiße Vaseline und/oder Paraffin. Das Arzneimittel kann für die topische Applikation auch in Form von Verbänden, Pflastern, Kompressen, Salben oder Gelen zubereitet sein.
- 20 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Invasoms zur Therapie einer Hauterkrankung, die durch die Beteiligung des Immunsystems der Haut gekennzeichnet ist. Der Begriff Therapie umfaßt dabei sowohl die kurative oder palliative Behandlung bereits bestehender Erkrankungen als auch die Prävention von Erkrankungen.
- 25 Das Immunsystem der Haut bilden zum einen die in der Haut bereits vorhandenen Zellen, wie beispielsweise Dendritische-Zellen, aber auch die jeweils bei Erkrankung, Infektion und/oder entzündlichen Prozessen in die Haut infiltrierenden Immunzellen, wie beispielsweise T-Zellen, Langerhans-Zellen und Makrophagen. Bei einer Beteiligung des Immunsystems der Haut ist beispielsweise eine gegenüber
- 30 gesunder Haut erhöhte Infiltration der Immunzellen in die Haut bzw. Aktivierung der genannten Immunzellen zu beobachten, ohne daß tatsächlich eine Verwundung oder Infektion der Haut vorliegt. Ob an einer Hauterkrankung das Immun-

stem der Haut beteiligt ist, läßt sich durch die klinisch bestimmbaren Parameter Rötung, Erwärmung und/oder Schwellung der Haut erkennen. Bei Vorliegen dieses Befunds wird als weiteres Kriterium die Menge der in der Haut exprimierten Zytokine und/oder die Anzahl der Immunzellen bzw. aktivierten Immunzellen in  
5 der Haut herangezogen.

Zytokine, die bei Hauterkrankungen, an denen das Immunsystem der Haut beteiligt ist verstärkt exprimiert werden, umfassen beispielsweise Interferon- $\gamma$ , IL-2, IL-1 $\beta$  oder IL-12. Die Menge der in der Haut exprimierten Zytokine läßt sich auf Nukleinsäureebene beispielsweise durch RT-PCR, „RNAse Protection Assays“ oder  
10 „Nuclear Run Ons“ und auf Proteinebene beispielsweise durch „Western-Blots“ oder ELISA bestimmen. Dem Fachmann sind weitere Verfahren bekannt, die es erlauben das Expressionsniveau von Zytokinen in der Haut zu bestimmen. Hierbei wird das jeweils bestimmte Expressionsniveau in der erkrankten Haut mit dem  
15 Expressionsniveau in gesunder Haut verglichen. Eine Hauterkrankung an der das Immunsystem beteiligt ist liegt vor, wenn die Expression des jeweiligen Zytokins in der kranken Haut gegenüber der gesunden Haut um mindestens das ca. 2-fache, vorzugsweise um mindestens das ca. 5-fache, bevorzugter um mindestens das ca. 10-fache und am meisten bevorzugt um mindestens das ca. 20-fache erhöht ist.

20 Immunzellen, die bei Hauterkrankungen, an denen das Immunsystem der Haut beteiligt ist, in größerer Menge in der Haut vorkommen, umfassen beispielsweise CD4<sup>+</sup>-Zellen, CD8<sup>+</sup>-Zellen, Langerhans-Zellen und Makrophagen. Die Menge der in der Haut vorkommenden Immunzellen läßt sich beispielsweise durch FACS-  
25 Analyse, histologisch und/oder immunhistologisch bestimmen. Dem Fachmann sind weitere Verfahren bekannt, die es erlauben, die Menge der Immunzellen in der Haut zu bestimmen. Hierbei wird die jeweils bestimmte Immunzellmenge, vorzugsweise die Menge der aktivierten Immunzellen, in der erkrankten Haut mit der Menge der Immunzellen, vorzugsweise der Menge der aktivierten Immunzellen,  
30 len, in gesunder Haut verglichen. Eine Hauterkrankung, an der das Immunsystem beteiligt ist liegt vor, wenn die Menge der Immunzellen, insbesondere der aktivierten Immunzellen, in der kranken Haut gegenüber der gesunden Haut um min-

destens ca. 30%, vorzugsweise um mindestens ca. 100%, bevorzugter um mindestens ca. 200% und am meisten bevorzugt um mindestens ca. 500% erhöht ist.

5 Eine solche Beteiligung des Immunsystems liegt beispielsweise bei den Hauterkrankungen Alopecia areata, Alopecia totalis, Alopecia subtotalis, Alopecia universalis, Alopecia diffusa, atopische Dermatitis, Lupus erythematoses der Haut, Lichen planus, Dermatomyositis der Haut, atopisches Ekzem, Neurodermitis, Morphea, Sklerodermie, Psoriasis vulgaris, Psoriasis capitis, Psoriasis guttata, Psoriasis inversa, Alopecia areata Ophiasis-Typ, androgenetische Alopezie, allergisches Kontaktekzem, irritatives Kontaktekzem, Kontaktekzem, Pemphigus vulgaris, Pemphigus foliaceus, Pemphigus vegetans, vernarbendes Schleimhautpemphigoid, bullöses Pemphigoid, Schleimhautpemphigoid, Dermatitis, Dermatitis herpetiformis duhring, Urticaria, Necrobiosis lipoidica, Erythema nodosum, Lichen vidal, Prurigo simplex, Prurigo nodularis, Prurigo acuta, lineare IgA Dermatose, polymorphe Lichtdermatose, Erythema solaris, Lichen sclerosus et atrophicus, Exanthem der Haut, Arzneimittlexanthem, Purpura chronica progressiva, dihidrotisches Ekzem, Ekzem, fixes Arzneiexanthem, photoallergische Hautreaktion, Lichen simplex eriorale Dermatitis oder "Graft versus Host-Disease" ist.

20

Eine besonders bevorzugte Verwendung der erfindungsgemäßen Invasomen ist die Prävention und/oder Therapie von Alopecia areata.

25 Die folgenden Beispiele und die Tabelle dienen lediglich der Illustration des Erfindungsgedankens, schränken jedoch den Gegenstand der Erfindung nicht ein.

## Tabelle

5      Tabelle 1:      Haarwachstum nach Behandlung mit Invasomen, die Cyclosporin A oder Cyclosporin A und Terpene enthalten, im DEBR-Rattenmodell. I: Invasomen mit Terpenen (D-Limonen, Citral und Cineol); F: Invasomen ohne Terpene; C: Kontrolle. Als Kontrollgruppe wurden Ratten mit natürlichem Haarwachstum gewählt. Das Haarwachstum wurde anhand der folgenden frei gewählten Skala beurteilt: - = große Regionen der Haut sind völlig haarfrei; + = Bereiche der Haut mit sehr spärlichem Haarbewuchs; ++ = Bereiche der Haut mit mittlerem Haarwachstum; +++ = scheinbar normale Haardichte.

10

15

## Beispiele

1. Herstellung der Invasomen

Die Invasomen wurden mit dem Alkohol-Lösungsverfahren hergestellt. Eine geeignete Menge Phospholipon 80 (Nattermann GmbH, Deutschland) und Ethanol

20 (im Verhältnis 3:1 = 13,3 Gewichts-% an der Endmischung) wurden gemischt und für 5 Minuten gevortext. Dann wurde Cyclosporin A (0,5 Gewichts-% an der Endmischung) und D-Limonen, Cinneol und Citral (im Verhältnis 10:45:45 v/v; 2 Gewichts-% an der Endmischung) hinzugefügt und das Gemisch erneut gevortext. Daran schloß sich für 5 Minuten eine Sonifizierung mit Ultraschall an (Branson ultrasonic cleaner, Connecticut, USA).

25 Eine geeignete Menge Phosphatpuffer pH 7,4 (86,17 Gewichts-% an der Endmischung im Falle, daß keine Terpene zugesetzt wurden oder 84,17 Gewicht-% an der Endmischung beim Zusatz von Terpenen) wurde tropfenweise unter fortgesetztem Rühren zu dem ethanolischen Gemisch aus Lipid und Cyclosporin hinzugesetzt, bis eine grobkörnige Suspension

30 erhalten wurde. Diese multilamellaren Vesikel wurden dann sonifiziert oder mit einer Avestinpresse (Avestin EmulsiFlex- C5, Canada) zuerst für 5 min über einen

200 nm Polycarbonatfilter, dann für 10 min über einen 100 nm Polycarbonatfilter und schließlich über einen 50 nm Polycarbonatfilter filtriert, bis die Durchschnittsgröße der Invasomen 50-70 nm betrug. Alle Filter wurden von Costar (Costar Nuclepore Polycarbonate, USA) erhalten. Der Durchmesser der Invasomen wurde mit einem Zetasizer IV (Malvern Instruments, Malvern UK) bestimmt. Der Durchmesser der Invasomen war im Bereich von 50-70 nm. Anschließend wurde der Polydispersionsindex (PI) als ein Maß für die Homogenität der erhaltenen Invasomenzubereitung beurteilt. Der PI für die Invasomen lag unter 0,3. Dieses Ergebnis deutet auf eine homogene Invasomenpopulation hin.

10

## 2. Behandlung von DEBR-Ratten mit Invasomen

15 DEBR-Ratten mit einem Durchschnittsalter von 19 Monaten (das Alter lag im Bereich von 14-26 Monate) und mit einem Gewicht im Bereich von 200-350 g wurden in dem Experiment verwendet. Die Ratten wurden in Einzelkäfigen mit Wasser und Nahrung nach Wunsch gehalten. Der beobachtete Haarverlust reichte von großen kahlen Flächen an den Flanken der Tiere und haarlosen Bereichen auf dem Kopf bis zum fast vollständigen Verlust aller Kopf- und Körperhaare. Die Ratten wurden in 3 Gruppen à 5 Tiere mit ähnlichem Haarverlust (Gruppe I, II und III) eingeteilt. Die Experimente wurden mit den beiden vorangehend beschriebenen Invasomentypen mit oder ohne zugesetzte Terpene durchgeführt. Die Invasomenkontrolle wurde in gleicher Weise, jedoch ohne Cyclosporin A hergestellt. Die liposomalen Zubereitungen wurden nicht-okklusiv auf dem Rücken (dorsale Seite) der Ratten aufgetragen. Für die Auftragung wurde ein abgegrenzter Bereich von 2 x 2 cm auf dem Rücken der Ratten markiert.

Die Gruppe I wurde verwendet, um die Wirksamkeit Cyclosporin beladener Invasomen, die D-Limonen, Citral und Cinneol enthielten, auf das Haarwachstum zu untersuchen. Jeder Ratte wurde für 7 Wochen 2-mal am Tag 20-80  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  der Invasomzubereitung auf einen markierten 2 x 2 cm großen Bereich an einer der kahlen Flanken aufgetragen, während die gegenüberliegende (kontralaterale) Flanke mit der Kontrollzubereitung behandelt wurde.

Die Gruppe II wurde verwendet, um die Wirksamkeit Cyclosporin beladener Invasomen auf das Haarwachstum zu untersuchen. Jeder Ratte wurde für 7 Wochen 2-mal am Tag 20-80  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  der Invasomzubereitung auf einen markierten 2 x 2 cm großen Bereich an einer der kahlen Flanken aufgetragen, während die gegenüberliegende (kontralaterale) Flanke mit der Kontrollzubereitung behandelt wurde.

Ratten der Gruppe 3 wurde für 7 Wochen 2-mal am Tag 20-80  $\mu\text{l}/\text{cm}^2$  einer ethanolischen Cyclosporin A-Lösung (0,5%) innerhalb des markierten 2 x 2 cm großen Bereichs auf einer der kahlen Flanken aufgetragen, während die kontralaterale Flanke unbehandelt blieb.

Die morphologischen Änderungen wurden täglich untersucht. Vor der Behandlung hatten alle Ratten in Gruppe I und II große kahle Flanken in abdominalen, dorsalen, Kopf- und Schulterbereichen. Alle 5 Ratten der Gruppe I zeigten 7 Tage nach Behandlungsbeginn Haarwachstum auf der behandelten Seite, während kein Haarwachstum auf dem behandelten Kontrollbereich zu beobachten war. Am 21. Tag nach Behandlungsbeginn zeigten 4 der 5 Ratten spärlichen bis mittleren Haarwuchs und nach 36 Tagen hatte das Fell auf den behandelten Stelle wieder die normale Dichte erreicht. Während sich das Haarwachstum an der behandelten Stelle fortsetzte, war an anderen Stellen der Haut weiterer Haarverlust zu beobachten. Dies spricht dafür, daß die Wirkung des Cyclosporin A nur lokal auf die Auftragsstelle begrenzt war, und keine oder nur eine geringe systemische Wirkung des Cyclosporins auftrat. Dafür sprach auch, daß in einer HPLC-Analyse des Serums der Ratten 14 Stunden nach der ersten Behandlung, aber auch am Ende der Studie kein Cyclosporin A im Blut nachgewiesen werden konnte. Eine der 5 Ratten zeigte bereits nach 21 Tagen ein normales Haarwachstum am gesamten Körper, jedoch einen verstärkten Effekt an der behandelten Stelle. Diese Beobachtung läßt sich beispielsweise dadurch erklären, daß 2-3% der DEBR-Ratten auch ohne Behandlung ein spontanes Nachwachsen aller Haare zeigen.

Bei den 5 Ratten der Gruppe II wurden erste Anzeichen auf Haarwuchs bei allen Ratten 14 Tage nach Beginn der Behandlung beobachtet, während auf den Kontrollflächen kein Haarwachstum beobachtet werden konnte. Das Haarwachstum setzte sich innerhalb und unmittelbar angrenzend an die Anwendungsflächen fort und am 21. Tag war schwaches bis moderates Haarwachstum auf den behandelten Regionen zu beobachten. Das Haarwachstum setzte sich fort und führte nach etwa 42 Tagen an der Behandlungsstelle zur normalen Felldichte. 14 Stunden nach Beginn der Behandlung und am Ende der Behandlung konnte mit HPLC-Analyse keine Cyclosporin A im Blut der Ratten nachgewiesen werden. Wiederum zeigte eine der Ratten, wie bereits bei den Ratten der Gruppe I beobachtet, Haarwachstum am gesamten Körper.

Die Ratten der Gruppe III zeigten während des gesamten Behandlungszeitraums kein Haarwachstum, vielmehr setzte sich der Haarverlust an anderen Stellen des Körpers bei allen Ratten in dieser Gruppe fort.

Die vorangehend beschriebenen Ergebnisse sind in der Tabelle 1 zusammengefaßt.

### 3. HPLC-Analyse

Das verwendete HPLC-System war eine Merck-Hitachi HPLC 655 A-12 Flüssigchromatographiepumpe, die mit einem Kontron 360 Autosampler und mit einer Merck-Hitachi L-5000 LC-Kontrolleinheit ausgerüstet war. Die verwendete Säule war eine LiChrospher 100 RP-18-Säule, die sphärisch geformte 5 µm Silicagelpartikel enthielt. (3 mm I.D. und 125 mm Länge). Der UV-Detektor war ein Merck-Hitachi L-4000 UV-Absorptionsdetektor. Der verwendete Integrator war ein Merck-Hitachi D-7500 Integrator. Die für die Elution verwendete Flüssigphase war Methanol:Wasser:Acetonitril im Verhältnis 10:30:60. Die Flußrate betrug 0,7 ml/min, wobei die Säulentemperatur auf 75°C gehalten wurde. Der verwendete Druck betrug 43-44 bar. Die UV-Detektion erfolgte bei 208 nm. Die Retentionszeit für Cyclosporin A war 8,65 Minuten.



- Eine Cyclosporin-Standardlösung wurde zur Eichung des Systems verwendet, wobei das Detektionslimit bei ca. 50 ng/ml lag. Über den gesamten Eichbereich bis 7000 ng/ml Cyclosporin A wurde ein linearer Zusammenhang zwischen Absorption und Konzentration beobachtet.
- 5

### **Zusammenfassung**

- Die vorliegende Erfindung betrifft Invasomen, die mindestens ein neutrales Lipid
- 5 und mindestens ein Immunsuppressivum enthalten, deren Herstellung und deren Verwendung zur Therapie einer Hauterkrankung, die durch eine Beteiligung des Immunsystems der Haut gekennzeichnet ist.

### Patentansprüche

- 5 1. Invasom enthaltend:
- a) mindestens ein neutrales Lipid in einem Lipidgemisch, wobei das neutrale Lipid an dem Lipidgemisch einen Anteil im Bereich von 60 bis 94 Gew.-% hat; und
  - b) mindestens ein Immunsuppressivum.
- 10 2. Invasom nach Anspruch 1, wobei das Invasom das Lipidgemisch und das Immunsuppressivum in einem Gewichtsverhältnis von 1:1 bis 500:1, vorzugsweise von 2:1 bis 100:1 enthält.
- 15 3. Invasom nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Invasom einen Durchmesser von 30 bis 200 nm aufweist.
- 20 4. Invasom nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Lipidgemisch aus Sojabohnen, Kattunsamen, Kokosnußkern, Erdnuß, Saflorsamen, Sesamsamen, Sonnenblumensamen, Leinsamen, Raps, Weizenkeimen, Oliven, Walfett, Stratum corneum Lipid, Rinderklauenöl und/oder Ei gewonnen wird.
- 25 5. Invasom nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das neutrale Lipid an dem Lipidgemisch einen Anteil im Bereich von 80 bis 90 Gew.-% hat.
- 30 6. Invasom nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei das neutrale Lipid ein Glycerophospholipid, insbesondere ein Phosphatidylcholin, ein Steroid, ein Glycerophosphonolipid, ein Glycerophosphinolipid und/oder ein Sphingolipid ist.

7. Invasom nach einem der Ansprüche 1 bis 6, wobei das Invasom ein oder mehrere Terpene enthält.
- 5 8. Invasom nach Anspruch 7, wobei das Terpen Cineol, Citral, Limonen, insbesondere D-Limonen, Menthan, Terpinen, Terpinolen, Menthol, insbesondere l-Menthol, Carveol, insbesondere 1-Carveol, Menthon, Carvon, Pinen, insbesondere  $\beta$ -Pinen, Caren, insbesondere 3-Caren, Terpeneol, Terpinen-4-ol, Pulegon, Piperiton, Cyclohexanoxid, Limonenoxyl, Pinenoxyl, Cyclopentenoxid, Ascaridol, 7-Oxybicyclo-[2.2.1]-heptan, Cymol, Camphen, Citronellol, Geraniol, Nerol, Linalool, Borneol, Thujol, Sabinol, Myrtenol, Thymol, Verbenol, Fenchol, Piperitol, Perillaaldehyd, Phellandral, Citronellal, Myrtenal, Piperiton, Thujon, Umbellolun, Verbenon, Chrysanthemon, Fenchon, Campher, Chinon, Menthofuran, Linalooloxid, Rosenoxid und/oder Quinghaosu ist.
- 15 9. Invasom nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Immunsuppressivum ein Glucokortikoid, insbesondere Beclomethason, Betamethason, Clocortolon, Cloprednol, Cortison, Dexamethason, Fludrocortison, Fludroxycortid, Flumetason, Fluocinolonacetamid, Fluocinonid, Fluocortolon, Fluormetholon, 20 Fluprednidenacetat, Hydrocortison, Paramethason, Prednisolon, Prednison, Prednylidin, Pregnenolon, Triamcinolon oder Triamcinolonacetamid, ein Cyclosporin, insbesondere Cyclosporin A, Mycophenolatmofetal, Tacrolimus, FK 506, Azathioprin, Ganciclovir, ein Anti-Lymphozytenglobulin, Ascomycin und/oder Methotrexat ist.
- 25 10. Invasom nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei das Immunsuppressivum in Form einer Nukleinsäure ist, die für mindestens ein immunsupprimierendes Peptid und/oder Protein kodiert.
- 30 11. Verfahren zur Herstellung eines Invasoms gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß das Lipidgemisch und das mindestens eine Immunsuppressivum gemischt werden.

12. Arzneimittel enthaltend ein Invasom gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 und geeignete Hilfs- und Zusatzstoffe.
- 5 13. Verwendung eines Invasoms gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Therapie einer Hauterkrankung, die durch eine Beteiligung des Immunsystems der Haut gekennzeichnet ist.
- 10 14. Verwendung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die Hauterkrankung Alopecia areata, Alopecia totalis, Alopecia subtotalis, Alopecia universalis, Alopecia diffusa, atopische Dermatitis, Lupus erythematoses der Haut, Lichen planus, Dermatomyostis der Haut, atopisches Ekzem, Neurodermitis, Morphea, Sklerodermie, Psoriasis vulgaris, Psoriasis capitis, Psoriasis guttata, Psoriasis inversa, Alopecia areata Ophiasis-Typ, androgenetische Alopezie, allergisches Kontaktekzem, irritatives Kontaktekzem, Kontaktekzem, Pemphigus vulgaris, Pemphigus foliaceus, Pemphigus vegetans, vernarbendes Schleimhautpemphigoid, bullöses Pemphigoid, Schleimhautpemphigoid, Dermatitis, Dermatitis herpetiformis duhring, Urticaria, Necrobiosis lipoidica, Erythema nodosum, Lichen vidal, Prurigo simplex, Prurigo nodularis, Prurigo acuta, lineare IgA Dermatose, polymorphe Lichtdermatose, Erythema solaris, Lichen sclerosus et atrophicans, Exanthem der Haut, Arzneimittel-exanthem, Purpura chronica progressiva, dihidrotisches Ekzem, Ekzem, fixes Arzneiexanthem, photoallergische Hautreaktion, Lichen simplex eriorale Dermatitis oder "Graft versus Host-Disease" ist.
- 15
- 20
- 25

Tabelle 1

Ratte Nr.	Ge- schlecht	Alter der Ratte bei Beginn des Experiments	Wachstumsstatus des Haars					
			Tag 0	Tag 7	Tag 14	Tag 21	Tag 35	Tag 42
2-I	W	14	-	-/+	+ /++	++	++ /++++	++ /++++
7-I	W	21	-	+	++	++ /++++	++++	++++
8-I	W	21	-	-/+	+	+ /++	+ /++	++
9-I	W	21	-	-/+	+	+ /++	+ /++	++
10-I	W	21	-	-/+	+ /++	++	++ /++++	++ /++
1-F	W	14	-	-	+	++	++ /++++	++++
4-F	W	21	-	-/+	+	+ /++	+ /++	+ /++
6-F	W	21	-	-	-/+	++	++	++ /++++
13-F	M	18	-	-	-/+	+	++	++++
14-F	M	18	-	-	-/+	+	+ /++	++
3-C	W	14	++	++	++	++	++	+
5-C	W	26	+ /++	+ /++	+ /++	+ /++	+ /++	+
11-C	M	24	++	++	++	++	++	+
12-C	M	18	++	++	++	++	++	++
15-C	W	18	+ /++	+ /++	+ /++	+ /++	+ /++	+ /++